

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 515–519

Hochempfindlicher Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Pankreas-Lipase

Von G. Grenner, Gerlinde Deutsch, R. Schmidtberger und F. Dati

Forschungslaboratorien der Behringwerke AG, Marburg/Lahn

(Eingegangen am 5. Februar/21. April 1982)

Herrn Professor Weissermel zum 60. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Es wird ein hochempfindlicher und spezifischer Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Pankreas-Lipase in Seren und Plasmen beschrieben. Der Test ist nach dem Sandwich-Verfahren aufgebaut, die Gesamtinkubationszeit beträgt 4,5 Stunden bei 20–25 °C. Der Meßbereich liegt zwischen 3 und 300 µg/l Lipase (1 + 10-Verdünnung der Proben), als untere Nachweisgrenze wurden 0,3 µg/l ermittelt (1 + 1-Verdünnung der Probe). Für die Präzision in der Serie ergaben sich Variationskoeffizienten zwischen 2,9 und 6,5%, von Tag zu Tag wurden Werte zwischen 4,4 und 10,5% gefunden.

Aus der Lipase-Bestimmung in 369 Seren von gesunden Erwachsenen errechnete sich ein Referenzbereich von 7,7 bis 56 µg/l (2,5.–97,5. Perzentil, Median 23 µg/l). Im Nabelschnurserum wurden sehr niedrige Konzentrationen bestimmt (Median 2,8 µg/l). Zwischen 3 und 50 Jahren bleibt die Lipasekonzentration annähernd konstant (Median 15–20 µg/l), bis zum 70. Lebensjahr erfolgt dann ein Anstieg des Median auf 26 µg/l.

A highly sensitive enzyme immunoassay for the determination of pancreatic lipase

Summary: A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for the determination of pancreatic lipase is described. The test follows the sandwich principle; total incubation time is 4.5 hours at 20–25 °C. Lipase concentrations between 3 and 300 µg/l can be quantified (sample dilution 1 + 10); the lower detection limit is 0.3 µg/l (sample dilution 1 + 1). Coefficients of variation from 2.9 to 6.5% for the in batch precision, and from 4.4 to 10.5% for the day-to-day precision were found.

A reference range from 7.7 to 56 µg/l was calculated from the lipase concentrations in 369 serum samples from healthy adults (2.5th–97.5th percentile, median 23 µg/l). Very low concentrations were found in cord blood (median 2.8 µg/l). The lipase level remains quite constant between the ages of 3 and 50 years (median 15–20 µg/l); at the age of 70 years a median of 26 µg/l is reached.

Einleitung

Die menschliche Pankreas-Lipase (EC 3.1.1.3) ist ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 40000–46000 (1, 2, 3), das Glycerinester langkettiger Fettsäuren hydrolysiert. Beim Übergang des Enzyms von der Bauchspeicheldrüse zum Gastrointestinaltrakt wird eine geringe Menge ins Blut abgegeben. Bei bestimmten Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse, wie z.B. akuter Pankreatitis, wird eine erhöhte Konzentration von Lipase im Serum beobachtet.

Neben der Bestimmung der α -Amylase, des immunreaktiven Trypsins und des Chymotrypsins im Stuhl hat die Lipase-Bestimmung in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Pankreaserkrankungen eine große Bedeutung. Pankreas-Lipase wird zur Zeit in den klinisch-chemischen Labors mittels kommerzieller turbidimetrischer Verfahren (z.B. 4, 5) oder apparativ aufwendiger Titrationmethoden (6, 7) bestimmt. Diese Methoden sind zum Teil nicht spezifisch für die Pankreas-Lipase, außerdem sind sie aufgrund ihrer relativ geringen Empfindlichkeit nur zur Messung erhöhter Lipasekonzentrationen einsetzbar. Messungen im Normalbereich können nur ungenau durchgeführt werden, bei subnormalen Konzentrationen versagen diese Methoden.

Eine immunchemische Methode zur Bestimmung der Lipase, wie z.B. ein Enzymimmunoassay, ist unabhängig von spezifischen Substraten, Cofaktoren und anderen Lipasen und sollte bei ausreichender Empfindlichkeit auch eine exakte Erfassung von Lipase im normalen und subnormalen Konzentrationsbereich erlauben.

0340-076X/82/0020-0515\$02.00
© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

Material und Methoden

Probenmaterial

Serum- und Plasmaproben, die zur Ermittlung der Referenzwerte verwendet wurden, stammten von gesunden Blutspendern ohne klinische Symptome. Seren von Patienten mit Pankreas-Erkrankungen und Serumproben von Gesunden vor und nach Heparin-Gabe zur Induktion von post-Heparin-Lipasen wurden uns von verschiedenen Kliniken zur Verfügung gestellt.

Reagenzien

Anti-Lipase-Antiseren wurden durch Immunisierung von Schafen und Kaninchen mit hochgereinigter Lipase (2) (spezifische Aktivität 2000 IU/mg, Triolein als Substrat bei 25 °C) gewonnen. Antikörper vom Schaf wurden zur Herstellung von Antikörper-beschichteten 2 ml-Kunststoffröhrchen verwendet (8), Antikörper vom Kaninchen wurden mit Peroxidase nach der Metaperiodat-Methode (9) konjugiert. Das Konjugat wurde in 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, der 100 ml/l Rinderserum enthielt, auf eine Konzentration von 0,5 mg/l verdünnt. Als Standards wurden Verdünnungen von reiner Lipase in einem Lipase-freien Humanserum bzw. in 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4, der 10 g/l Humanalbumin enthielt, eingesetzt (Konzentration 0–300 µg/l). Lipase-freies Serum wurde durch Behandlung von normalem Humanserum mit trägergebundenen Antikörpern gegen Lipase gewonnen.

Zur Vorverdünnung der Proben wurde Rinderserum, das 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 enthielt (Inkubationsmedium), verwendet. Die Waschlösung bestand aus Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung pH 7,2, die das Detergens Tween® 20 enthielt. Die an der Röhrchenwand gebundene Peroxidase-Aktivität bestimmten wir mit 15 mmol/l o-Phenyldiamin und 7 mmol/l Wasserstoffperoxid in 200 mmol/l Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (Chromogenlösung). Zum Unterbrechen der enzymatischen Katalyse wurde 250 mmol/l Schwefelsäure verwendet.

Testdurchführung

Der Enzymimmunoassay zur Lipase-Bestimmung ist nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut. Während der ersten Inkubation wurde die Lipase an Antikörper, die an der Oberfläche der Kunststoffröhrchen fixiert sind, gebunden. In der zweiten Stufe reagierte der Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Lipase mit den noch freien Antigendeterminanten, anschließend wurde die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Tabelle 1 zeigt die Testdurchführung.

Die Standards wurden 1 + 10, Serumproben entsprechend der zu erwartenden Lipase-Konzentration 1 + 1, 1 + 10 oder 1 + 100 in Inkubationsmedium verdünnt. Die Lipasekonzentrationen im Serum wurden an der Referenzkurve abgelesen.

Ergebnisse

Meßbereich und Nachweisgrenze

Abbildung 1 zeigt eine typische Kalibrierkurve für den Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Pankreas-Lipase. Im Bereich zwischen 3 und 300 µg/l bei einer 1 + 10-Verdünnung der Standards ergibt sich bei doppelt-logarithmischer Auftragung eine fast lineare Beziehung zwischen Konzentration und Absorption. Die Standards werden generell 1 + 10 verdünnt. Bei 1 + 1-Verdünnung der Proben ergibt sich ein Meßbereich von 0,6–60 µg/l, bei 1 + 10-Verdünnung von 3–300 µg/l und bei einer 1 + 100-Verdünnung von 30–3000 µg/l. Da sich keine Unterschiede in der Signalthöhe bei Verwendung von Standards auf Serum- oder Albumin-

Tab. 1. Testdurchführung des Enzymimmunoassays Lipase.

	Standardproben										Kontrollproben		Patientenproben			
Ansatz Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16 etc.
µl:																
Standard*) S ₁	200	200														
Standard S ₂			200	200												
Standard S ₃					200	200										
Standard S ₄							200	200								
Standard S ₅									200	200						
Kontrollserum											200	200				
Patientenserum													200	200	200	200
Inkubation 2 Stunden bei 20–25 °C in Antikörper-beschichteten Kunststoffröhrchen Absaugen und einmal waschen																
Anti-Lipase / Peroxidase-Konjugat (µl)	←————— 200 —————→															
Inkubation 2 Stunden bei 20–25 °C Absaugen und zweimal waschen																
Chromogen-Substrat-Lösung (µl)	←————— 200 —————→															
Inkubation 30 Minuten bei 20–25 °C																
Stopplösung (µl)	←————— 1000 —————→															
Messung der Absorption bei 492 nm																

*) Standard-Konzentrationen: S₁ 3 µg/l S₄ 100 µg/l
S₂ 10 µg/l S₅ 300 µg/l
S₃ 30 µg/l

Matrix zeigten, wurden für alle weiteren Untersuchungen Standards auf Albuminbasis verwendet.

Von 60 untersuchten pathologischen Seren mit erhöhter Lipasekonzentration lagen 64% unter 300 µg/l, 33% im Bereich zwischen 300 und 3000 µg/l und 3% über 3000 µg/l. Der höchste gemessene Wert lag bei 5000 µg/l.

Die untere Nachweisgrenze, ausgedrückt als das Dreifache der Standardabweichung bei der Lipasekonzentration Null (Lipase-freies Serum) beträgt etwa 0,3 µg/l bei einer 1 + 1-Verdünnung der Probe bzw. etwa 1,5 µg/l bei einer 1 + 10-Verdünnung.

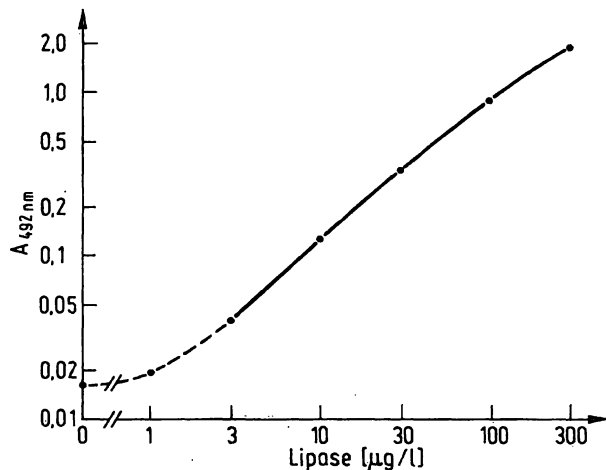


Abb. 1. Kalibrierkurve Enzymimmunoassay Lipase.

Präzision

Die Ergebnisse zur Präzision des Tests sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Sie wurden an Seren mit Lipase-Konzentrationen zwischen 7,5 und 250 µg/l ermittelt. In der Serie ergaben sich Variationskoeffizienten zwischen 2,9 und 6,5%, von Tag zu Tag wurden Werte zwischen 4,4 und 10,5% erhalten.

Tab. 2. Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays Lipase.

Präzision in der Serie (n = 20 Einzelbestimmungen):

Lipase-Konzentration (µg/l)	Variationskoeffizient (%)
7,5	5,3
24	3,5
92	2,9
247	6,5

Präzision von Tag zu Tag (n = 10 Tage)*):

Lipase-Konzentration (µg/l)	Variationskoeffizient (%)
8,0	9,5
26	7,3
87	4,4
255	10,5

*) Jeweils 1 Doppelbestimmung an 10 Tagen

Wiederfindung, Linearität

Die Wiederfindungsraten bei Aufstockversuchen von verschiedenen Humansenen mit Pankreas-Lipase sind in Tabelle 3 zusammengestellt, sie liegen zwischen 92 und 106%.

Tab. 3. Wiederfindung im Enzymimmunoassay Lipase.

Probe Serum Nr.	Lipase- Kon- zentra- tion (µg/l)	Wiederfindung bei Zusatz von					
		25 µg/l		100 µg/l			
		Ist	Soll	Anteil des Soll- wertes	Ist	Soll	Anteil des Soll- wertes
1 (Li- pase- frei)	0	24,5	25	0,98	102	100	1,02
2	19,5	46,5	44,5	1,04	115	119,5	0,96
3	40	69	65	1,06	147	140	1,05
4	95	114	120	0,95	191	195	0,98
5	152	163	177	0,92	235	252	0,93

Angegebene Lipase-Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen in drei Serien.

Zur Prüfung auf Linearität bei Verdünnung (Verdünnungsechtheit) wurden Seren mit Inkubationsmedium in verschiedenen Verhältnissen verdünnt und die Lipase-Konzentration im Enzymimmunoassay bestimmt. Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß keine Beeinflussung des Ergebnisses durch unterschiedliche Verdünnungsverhältnisse eintritt.

Tab. 4. Linearität des Enzymimmunoassays Lipase.

Probe	Probenverdünnung	Kon- zentration im Testansatz (µg/l)	Kon- zentration in der Probe (µg/l)
A	1: 2	14,5	29
	1: 10	2,7	27
B	1: 2	12,2	24,5
	1: 10	2,5	25
C	1: 5	4,1	20,5
	1: 10	2,25	22,5
	1: 50	0,41	20,5
D	1: 5	24	120
	1: 10	11,5	115
	1: 50	2,3	115
E	1: 50	27	1350
	1:100	14,5	1450

Verwendbarkeit von Plasmen

Von gesunden Spendern wurden am gleichen Tag Serum, Heparin-, EDTA- und Citratplasma abgenommen. Es konnte keine Beeinflussung der enzymimmunologischen Lipase-Bestimmung durch Antikoagulantien festgestellt werden.

Spezifität

Nach intravenöser Heparin-gabe werden im menschlichen Serum erhöhte Konzentrationen an Lipoprotein-Lipase und hepatischer Triglycerid-Lipase gemessen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Untersuchung von Proben vor und nach Induktion zusammengestellt. Die Heparin-induzierten Lipasen wurden radioimmunologisch (10), die Pankreas-Lipase mit dem beschriebenen Enzymimmunoassay gemessen. Die Konzentration der Pankreas-Lipase änderte sich nach Heparin-gabe nur geringfügig.

Tab. 5. Spezifität des Enzymimmunoassays zur Pankreas-Lipase-Bestimmung.

Probe Nr.	Konzentration		Hepatische Triglycerid-Lipase		Pankreas-Lipase	
	Lipoprotein-Lipase (mg/l)		(mg/l)		(µg/l)	
	vor Heparin-gabe	nach Heparin-gabe	vor Heparin-gabe	nach Heparin-gabe	vor Heparin-gabe	nach Heparin-gabe
1	0,09	5,9	0,28	23,2	21	25
2	0,32	6,1	—	18,9	25	28
3	0,20	3,8	—	17,1	7,8	8,8
4	0,37	4,4	0,65	27,2	15	17

Stabilität der Antigenität von Pankreas-Lipase im Serum

Humanseren wurden bei + 4 °C und bei + 25 °C über 4 Wochen gelagert. Die Lipase-Konzentrationen wurden im Enzymimmunoassay bestimmt. Im Vergleich zu bei - 70 °C gelagerten Proben dieser Seren ergab sich kein Konzentrationsabfall. Auch mehrfaches Einfrieren (5fach) hatte keinen Einfluß auf die ermittelten Lipase-Konzentrationen.

Referenzbereich, Altersabhängigkeit der Lipase-Konzentration

In 369 Seren von gesunden Blutspendern (Alter 18–65 Jahre, 205 männlich, 164 weiblich) wurde der Lipasegehalt bestimmt. 95% aller Werte (2,5. bis 97,5. Perzentil) liegen im Bereich zwischen 7,7 und 56 µg/l. Als Median (50. Perzentil) wurde ein Wert von 23 µg/l ermittelt.

Weißhaar et al. (11) fanden, daß die Lipase-Konzentration mit zunehmendem Alter ansteigt. Die Bestimmung erfolgte mittels Turbidimetrie. Angaben über Konzentrationen bei Neugeborenen und im Kindesalter liegen nicht vor.

Zur Feststellung einer Altersabhängigkeit wurde die Lipase-Konzentration in Nabelschnurseren und in Seren von Kindern und Erwachsenen mit Hilfe des Enzymimmunoassays bestimmt. 150 Nabelschnurseren, jeweils 20 Seren je Lebensjahr im Bereich von 1 bis 10 Jahren und 20 Seren für jedes Lebensjahrzehnt im Bereich von 11 bis 70 Jahren (11–20, 21–30 usw. bis 61–70 Jahre) wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in

Abbildung 2 dargestellt (doppelt-logarithmische Auftragung). Bei Neugeborenen ist im Nabelschnurserum nur eine sehr geringe Konzentration bestimmbar (Median 2,8 µg/l). Bis zum 3. Lebensjahr steigt der Lipasespiegel im Serum an, der Median liegt bei 15 µg/l. Zwischen dem 3. und 50. Lebensjahr bleibt die Lipase-Konzentration annähernd konstant. Im Lebensabschnitt zwischen 51 und 70 Jahren tritt eine stärkere Erhöhung ein (Median 26 µg/l). Der Streubereich der gemessenen Lipase-Konzentration läßt sich an den in Abbildung 2 eingezeichneten 5. und 95. Perzentilen erkennen.

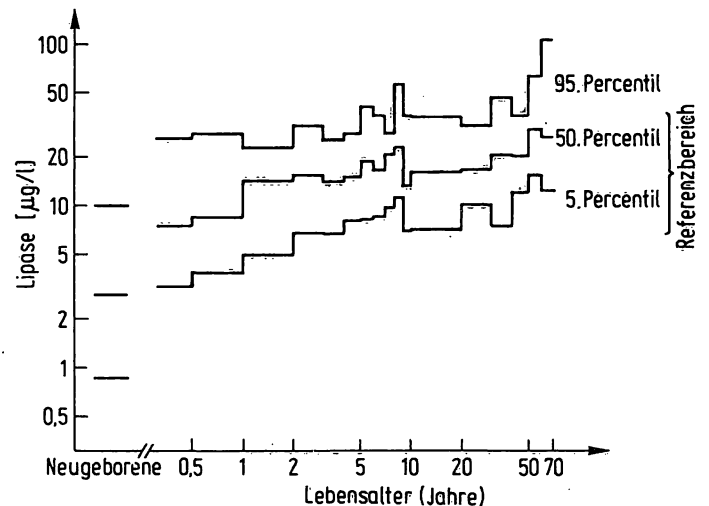


Abb. 2. Altersabhängigkeit der enzymimmunologisch bestimmten Lipase-Konzentration im Serum.

Diskussion

Zur Bestimmung der Mehrzahl der in der klinisch-chemischen Diagnostik wichtigen Enzyme ist die Messung der katalytischen Aktivität die Methode der Wahl. Solche Tests sind schnell und einfach durchführbar und lassen sich leicht automatisieren. Die Grenzen dieser Verfahren treten bei der Bestimmung von Isoenzymen und bei Enzymen mit geringer katalytischer Aktivität zutage. Auch das Fehlen photometrisch gut erfaßbarer Substrate erschwert gelegentlich die Entwicklung einfacher Tests.

Versuche, zur Lipase-Bestimmung unphysiologische Substrate einzusetzen (12, 13), führten zu unspezifischen Tests, da auch andere Hydrolasen angezeigt wurden. Ein Trübungstest (14) ist recht spezifisch, ca. 4% der Seren zeigen jedoch eine inverse Reaktionskinetik, solche Proben sind dann nicht bestimmbar. Diese Methoden sind ebenso wie die Titrationsmethoden (6, 7) nicht empfindlich genug, um im Normalbereich und insbesondere bei sehr niedrigen Lipase-Konzentrationen präzise Aussagen zu liefern.

Ähnlich wie bei der immunchemischen Bestimmung der sauren Prostata-Phosphatase (15) sollte ein Immunoassay die Pankreas-Lipase-Bestimmung empfindlicher und spezifischer machen.

Bislang wurden nur Immunpräzipitationsmethoden zur Pankreas-Lipase-Bestimmung beschrieben (2), deren Empfindlichkeit jedoch zur Erfassung der niedrigen Konzentrationen im Serum nicht ausreicht.

Unsere positiven Erfahrungen mit den nach dem Sandwich-Verfahren aufgebauten Enzymimmunoassays zur Bestimmung von in sehr geringen Konzentrationen in Serum vorliegenden Proteinen wie z. B. Immunglobulin E (16), saure Prostata-Phosphatase (17) und α -Foetoprotein (18) legten nahe, dieses Verfahren auch für die Bestimmung der Pankreas-Lipase anzuwenden. Mit einer Nachweisgrenze von 0,3 $\mu\text{g/l}$ ist der Test so empfindlich, daß Konzentrationen unterhalb des Normalbereiches ($< 7 \mu\text{g/l}$) ohne Probleme erfaßt werden können. Der Meßbereich erstreckt sich über zwei Dekaden, bei einer 1 + 10-Vorverdünnung des Patientenserums von 3 bis 300 $\mu\text{g/l}$. Patientenserum im niedrigeren ($< 3 \mu\text{g/l}$) oder im höheren Konzentrationsbereich ($> 300 \mu\text{g/l}$) können erfaßt werden, wenn eine entsprechende Verdünnung (1 + 1 bzw. 1 + 100) gewählt wird. Voraussetzung für ein solches Verfahren ist die hohe Wiederfindungsrate (Tab. 3) und die gute Linearität des Testes (Tab. 4).

Lipasen nicht-pankreatischen Ursprungs, wie z. B. die Lipoprotein-Lipase und hepatische Triglycerid-Lipase, werden vom Enzymimmunoassay nicht erfaßt. Ebenso werden keine Störungen bei hämolytischen, lipämischen und ikterischen Seren und hohen Rheumafaktor-Konzentrationen beobachtet (unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei der Untersuchung der Altersabhängigkeit der Lipase-Konzentration im Serum bestimmten wir sehr geringe Konzentrationen im Neugeborenen Serum. Ein anderes

Pankreas-Enzym, das Trypsin, liegt auch schon bei Neugeborenen in ähnlich hoher Konzentration wie bei Erwachsenen vor (19).

Vom 3. bis zum 50. Lebensjahr bleibt nach unseren Untersuchungen die Lipase-Konzentration annähernd konstant, so daß der an einem Kollektiv von 369 Personen ermittelte vorläufige Referenzbereich von 7,7–56 $\mu\text{g/l}$ als weitgehend altersunabhängig angesehen werden kann.

Der beschriebene heterogene Enzymimmunoassay erlaubt eine spezifische, empfindliche und präzise Bestimmung der Pankreas-Lipase im Serum und Plasma.

Erste Untersuchungen an Seren von Pankreatitis-Patienten zeigten erwartungsgemäß erhöhte Lipase-Konzentrationen bei akuter Pankreatitis, während bei chronischem Krankheitsbild subnormale Werte gefunden wurden. Über diese Ergebnisse soll an anderer Stelle ausführlich berichtet werden. Weitere interessante Fragestellungen, wie z. B. die Aussagekraft des Tests bei Verlaufskontrollen, bei Pankreas-Karzinom und bei cystischer Fibrose werden zur Zeit bearbeitet.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. K. P. Ringel, Sektion für Angewandte Immunologie, Universität Kiel, und Herrn Dr. O. Schrecker, Institut für Herzinfarktforschung, Universität Heidelberg, für die Bereitstellung der Serumproben.

Herr Dr. Schrecker bestimmte freundlicherweise auch die Konzentrationen der Lipoprotein-Lipase und hepatischen Triglycerid-Lipase im Radioimmunoassay.

Für die Durchführung der experimentellen Arbeiten danken wir Frau H. Burk und Herrn K. Krauß.

Literatur

1. Straube, E., Schütt, Chr., Brock, J. & Mücke, D. (1974) *Acta Biol. Med. Germ.* 33, 263–274.
2. Forssell, E. (1974) *Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser., V. Med.* 166, 1–36.
3. Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C. & Rathe, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 257–268.
4. Ziegenhorn, J., Neumann, U. & Knitsch, K. W. (1979) *Clin. Chem.* 25, 1067.
5. Temme, H. & Róka, L. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 193–194.
6. Rick, W. (1969) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 7, 530–539.
7. Tietz, N. W. & Fiereck, E. A. (1972) in *Standard Methods of Clinical Chemistry* (Cooper, G. R. ed.), New York Acad. Press, Vol. 7, pp. 19–31.
8. Catt, K. & Tregear, G. W. (1967) *Science* 158, 1570–1572.
9. Nakane, P. K. & Kawaoi, A. (1974) *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084–1091.
10. Greten, H., De Grelle, R., Klose, G., Rascher, W., de Gennes, J. L. & Gjone, E. (1976) *J. Lipid Research* 17, 203–210.
11. Weißhaar, H. D., Sudhoff, H., Koller, P. U. & Bablok, W. (1981) *Dtsch. Med. Wochenschr.* 106, 239–241.
12. Myrick, J. E. (1976) Dissertation, University of Alabama.
13. Fleisher, M. & Schwartz, M. K. (1971) *Clin. Chem.* 17, 417.
14. Lorentz, K. & Flatter, B. (1980) *Med. Labor* 33, 236–239.
15. Cooper, E. H., Glashan, R., Robinson, M. R. G. & Trautner, K. (1981) *Clin. Chim. Acta* 113, 27–34.
16. Fateh-Moghadam, A., Neumeier, O., Von Stetten, K., Dati, F. & Grenner, G. (1980) *Z. Anal. Chem.* 30, 123–124.
17. Grenner, G. (1980) *Clin. Chem.* 26, 987.
18. Dati, F., Grenner, G., Schmidtberger, R. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 216.
19. Borgström, A., Sveger, T., Lindberg, T., Kullander, S. & Svanberg, L. (1981) *Acta Paediatr. Scand.* 70, 619–621.

Dr. G. Grenner
Behringwerke AG
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1

